

Trabajo Fin de Grado

Generación “in situ” de nanopartículas de oro como base de nanobiosensores colorimétricos para la determinación de aminas biógenas

“In situ” generation of gold nanoparticles as the base of colorimetric nanobiosensors for
biogenic amines determination

Autora

Laura Blas Aguerri

Directora

Susana de Marcos Ruiz

Facultad de Ciencias

2019/2020

Agradecimientos

A mis padres por apoyarme en todas las decisiones que he ido tomando a lo largo de mi vida como estudiante.

A todos los amigos que he conocido a lo largo del grado, que espero que han estado durante todo el camino y sigan estando a mi lado.

A Susana por apoyarme en las horas de laboratorio y ayudarme en la realización de todo el trabajo.

Al grupo de Biosensores Analíticos por el gran ambiente que crean en las horas de trabajo en el laboratorio.

Este trabajo ha sido realizado con cargo al Proyecto CTQ2016-76846R (MINECO) y las ayudas a grupos de investigación DGA-FEDER (E25_17R).

Resumen

El estudio y aplicación de los nanopartículas de oro (AuNPs) ha supuesto una revolución en las investigaciones científicas, y la química analítica no ha sido ajena a ella. Dadas las excelentes propiedades físico-químicas de las AuNPs, se está llevando a cabo su implementación en biosensores ópticos, lográndose límites de detección realmente bajos con unos tiempos de detección y unos costes capaces de competir con técnicas analíticas más robustas como la cromatografía.

El objetivo de este trabajo es desarrollar un biosensor óptico para la rápida y específica determinación de tiramina y cadaverina utilizando las enzimas TAO y DAO respectivamente. Como agente colorimétrico se utilizarán las nanopartículas obtenidas in-situ durante la propia reacción enzimática y como detector, un smartphone con el que obtener las coordenadas RGB.

Durante el estudio se han optimizado los parámetros que influyen en la determinación: concentración de fosfatos y pH de la disolución amortiguadora, porcentaje de celulosa del soporte inmovilizador, concentración de Au(III), concentración de la disolución amortiguadora de fosfatos, temperatura de reacción y tiempos de adición y medida.

Abstract

The study and application of gold nanoparticles has been a revolution in scientific research, and analytical chemistry has not been absent from it. Given the excellent physical-chemical properties of AuNPs, their implementation in optical biosensors is being carried out, achieving really low detection limits with detection times and costs that can compete with more robust analytical techniques such as chromatography.

The aim of this work is to develop an optical biosensor for the rapid and specific determination of tyramine and cadaverine using the enzymes TAO and DAO respectively. The nanoparticles obtained in-situ during the enzymatic reaction itself will be used as a colorimetric agent and a smartphone will be used as a detector to get the RGB coordinates.

During the study, the parameters that have an influence on the determination have been optimized: concentration of phosphates and pH of the buffer solution, percentage of cellulose of the immobilizing support, concentration of Au(III), concentration of the phosphate buffer solution, reaction temperature and addition and measurement times.

Contenido

1.	INTRODUCCIÓN	5
1.1.	Sensores y biosensores	5
1.2.	Utilización de nanomateriales en determinaciones analíticas.....	8
1.2.1	Nanopartículas de oro en biosensores.....	8
1.3.	Determinación aminas biógenas	10
2.	OBJETIVOS	12
3.	RESULTADOS Y DISCUSIONES	13
3.1.	Estudio en disolución	13
3.1.1.	Estudio cinético de la reacción a diferentes concentraciones de tiramina	13
3.1.2.	Estudio de la repetitividad	14
3.1.3.	Características analíticas del método en disolución para la determinación de cadaverina y putrescina	15
3.2.	Estudio en celulosa.....	16
3.2.1.	Optimización porcentaje celulosa.....	16
3.2.2.	Optimización de la concentración de Au(III)	18
3.2.3.	Optimización concentración de fosfatos.....	19
3.2.4.	Optimización del pH	20
3.2.5.	Optimización tiempo de adicción.....	21
3.2.6.	Optimización tiempo de medida y temperatura del transcurso de la reacción	23
4.	PARTE EXPERIMENTAL	24
4.1.	Reactivos y disoluciones.....	24
4.1.1.	Reactivos generales.....	24
4.1.2.	Disoluciones de enzimas	24
4.1.3.	Aminas.....	25
4.2.	Instrumentación y material.....	25
4.2.1	Instrumentos	25
4.2.2	Materiales	25
4.3.	Procedimiento operativo	26
4.3.1.	Método en disolución	26
4.3.1.1	Disoluciones de tiramina	26
4.3.1.2	Disoluciones de cadaverina y putrescina	26
4.3.2.	Método en celulosa.....	27

5. CONCLUSIONES	27
6.BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. INTRODUCCIÓN

1.1.Sensores y biosensores

Los sensores y biosensores químicos han adquirido actualmente un interés renovado debido a las urgentes necesidades de disponer de más y mejor información analítica utilizando técnicas diferentes a las convencionales. Los sensores químicos representan una nueva clase de instrumentación analítica, caracterizada por sus reducidas dimensiones, bajo coste, fácil utilización y generación de la información en tiempo real. Los sensores químicos están formados por dos partes bien diferenciadas. Un elemento de reconocimiento molecular o iónico (receptor) que interacciona selectivamente con un determinado componente de la muestra (analito), y un elemento instrumental (transductor) que traduce la interacción en una señal procesable. Ambas partes pueden encontrarse más o menos integradas, pero en todo caso conectadas, ya que la señal primaria generada en la reacción de reconocimiento (de tipo electroquímico, óptico, térmico o másico) será convertida por el transductor en una señal secundaria.¹ (Figura 1.)

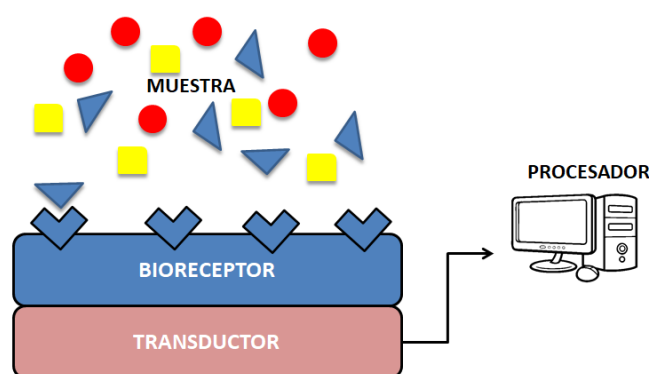


Figura 1. Esquema de un biosensor

La clasificación de los sensores y biosensores se puede realizar atendiendo a diferentes criterios, como son el tipo de receptor utilizado, la metodología empleada para inmovilizar este receptor o el tipo de transductor utilizado, siendo ésta última la más aceptada.¹ Un sensor puede ser clasificado en óptico, piezoeléctrico, térmico o electroquímico dependiendo del transductor utilizado para medir dichos cambios. Cuando el material receptor tiene una procedencia biológica (enzimas, anticuerpos o ADN), los sensores químicos son denominados biosensores.

El elemento biológico es capaz de reconocer la presencia, actividad o concentración de un analito específico en solución. El reconocimiento puede ser un proceso de unión, por ejemplo, un biosensor basado en la afinidad que existe con la unión de un anticuerpo, ácido nucleico o proteína. La interacción del elemento de reconocimiento con el analito resulta un cambio

medible en alguna de las propiedades de la disolución, como el consumo de un reactivo o formación de un producto.

La característica fundamental y más importante de un biosensor es el lugar donde se produce el reconocimiento para la interacción con el analito objetivo. Estos materiales biológicos pueden ser enzimas, anticuerpos o antígenos, oligonucleótidos como ADN, ARN, o moléculas de bajo peso molecular que presentan interacciones de afinidad con otros biomateriales como los cofactores.

Los biosensores enzimáticos representan el área más ampliamente estudiada, gracias a la alta especificidad de las interacciones enzima-sustrato, la sensibilidad y la elevada especificidad de medida de dichos dispositivos. La construcción de un biosensor enzimático requiere de la inmovilización o integración del biocatalizador en polímeros, membranas, pastas de carbono, celulosa etc. Cualquier cambio óptico o eléctrico en el soporte de apoyo como resultado del proceso biocatalítico se transduce en una señal óptica o electrónica del proceso biológico que tiene lugar en la superficie de detección.

En cuanto a la biosensibilidad, las interacciones entre los elementos de reconocimiento biológico y los analitos deben ser capaces de inducir señales que puedan ser recogidas e interpretadas por transductores ópticos (basados en la absorción, reflectancia, luminiscencia, rotación óptica, onda evanescente, y resonancia plasmónica superficial), como por transductores eléctricos (por ejemplo, corriente, potencial, capacitancia, impedancia, transducción piezoeléctrica, y la transducción de transistores de efecto de campo).

El transductor es uno de los componentes importantes en un biosensor, a través del cual la medición del analito(s) se logra mediante la transformación selectiva de una interacción biomolécula A-biomolécula B en una señal eléctrica u óptica cuantificable. En general, los transductores ópticos de los biosensores enzimáticos más comunes se basan en técnicas ópticas como la absorción, la reflectancia, la luminiscencia y la quimiluminiscencia, onda evanescente, resonancia plasmónica superficial, y interferometría.

En nuestro caso nos centraremos en los biosensores ópticos enzimáticos que son aquellos que transforman los cambios producidos por la interacción de un analito-receptor en una señal óptica.

Uno de los primeros biosensores ópticos de aplicación clínica fue una tira de prueba para la glucosa en orina comercializada en 1957, donde la glucosa oxidasa y la peroxidasa eran inmovilizadas en una almohadilla de celulosa. Durante la reacción, el H_2O_2 producido por la oxidación enzimática de la glucosa reacciona con o-tolidina dando lugar a un color rojo cuya intensidad era proporcional a la concentración de glucosa y permitía su determinación visual. A día de hoy se siguen utilizando este tipo de tiras reactivas en orina, por ejemplo el análisis de la presencia de nitritos vinculada a las infecciones de orina.²

El éxito de los biosensores enzimáticos se basa en dos factores principalmente: (1) la capacidad de inmovilización o fijación de las enzimas en sustratos sólidos o plataformas: este paso es extremadamente importante ya que el método de inmovilización puede mejorar la vida útil y el tiempo de almacenamiento de los biosensores. También se ve afectada la sensibilidad y el

límite de detección de los biosensores. (2) Los transductores ópticos pueden afectar a la sensibilidad, la selectividad y el límite de detección de los biosensores. La sensibilidad de un biosensor depende de la afinidad o de las propiedades catalíticas del componente biológico y de la sensibilidad del transductor físico-químico.

Entre los sensores más utilizados se encuentran los de absorbancia y luminiscencia. En los sensores de absorbancia la relación entre la intensidad de la luz incidente y la luz reflejada están en relación directa con la concentración del analito a determinar.

Dentro de los distintos mecanismos de transducción, los procesos fotoluminiscentes resultan especialmente atractivos para el desarrollo de sensores ópticos, ya que la radiación detectada puede diferenciarse de la radiación incidente sobre la fase activa por la longitud de onda. Además, dan lugar a sensores altamente sensibles que permiten determinar muy bajos niveles de concentración. Estas características hacen especialmente adecuado el uso de dichas técnicas fotoluminiscentes como técnicas de detección en el desarrollo de sensores químicos.^{3,4}

De las dos técnicas analíticas derivadas del fenómeno fotoluminiscente, la fluorescencia y la fosforescencia. La fluorescencia ha sido tradicionalmente la técnica empleada en el desarrollo de sensores ópticos luminiscentes. Sin embargo, es mucho menor el número de sensores fosforescentes a temperatura ambiente existentes. Esto se debe al escaso número de moléculas disponibles capaces de desarrollar fosforescencia. No obstante, en los últimos años la fosforescencia está cobrando cada vez más importancia como método de detección por las ventajas que presenta sobre la fluorescencia en el desarrollo de los sensores ópticos:

- Es posible desarrollar instrumentación sencilla, empleando componentes electrónicos de bajo coste que permitan la medida de tiempos de vida de fosforescencia; todo esto está permitido por los largos tiempos de vida en el estado triplete.
- Debido a que las posibles interferencias de emisión fluorescentes residuales o luz dispersa pueden ser evitadas (usando un tiempo de demora adecuado tras la excitación con fuentes pulsadas), es posible obtener relaciones señal/ruido elevadas.
- La gran separación existente entre las longitudes de onda de excitación y emisión fosforescente hace que la discriminación entre ellas sea más fácil mediante el uso de sistemas de selección espectral de bajo coste.
- Se obtienen sistemas más selectivos, ya que la fosforescencia es un fenómeno mucho menos común que la fluorescencia.

Existen, sin embargo, algunas desventajas fundamentales:

- Se limita el uso de este sistema de detección fosforescente puesto que existen pocas moléculas que presentan emisión fosforescente.
- Será necesario desoxigenar las muestras para poder observar la emisión fosforescente del analito, ya que el oxígeno es un desactivante muy eficaz de la fosforescencia.⁵

1.2 Utilización de nanomateriales en determinaciones analíticas

Actualmente, la nanotecnología es una de las tendencias más importantes en la ciencia de los materiales. La capacidad de manipular y sintetizar nuevos materiales desde el nivel atómico hasta el nivel macroscópico, ha permitido alcanzar un control sin precedentes de las propiedades finales de nuevos diseños.

Estos materiales se caracterizan por presentar al menos una dimensión en el rango de 1 a 100 nm, por ello, su caracterización precisa de la utilización de técnicas de caracterización estructural avanzadas como son: la microscopía electrónica de transmisión (TEM), microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM), dispersión de luz dinámica (DLS), la microscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), difracción de rayos X en polvo (XRD); u otras más sencillas como la espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) o la espectroscopía Uv-Vis.⁶

La principal ventaja de los nanomateriales procede de su reducido tamaño, lo cual permite disfrutar de una elevada relación superficie-volumen. El control de su tamaño, forma, superficie y naturaleza ha permitido desarrollar nuevas y prometedoras técnicas, así como aplicaciones en diferentes campos como la medicina, la industria, productos de la vida cotidiana, etc. Una de las áreas donde el desarrollo de estos materiales ha tenido un gran impacto es en la Química Analítica.

Destacar en este campo el uso de las nanoestructuras de metales que presentan plasmón superficial: nanopartículas, nanorods, nanobipiramides... Se trata de una cuasipartícula, resultado de la cuantización de las oscilaciones del plasma ocasionadas por el movimiento colectivo de los electrones a una frecuencia determinada. Este depende de la forma, tamaño y naturaleza de la NP (Au, Ag y Pt, son los más usados), así como del medio; por lo que modificando algunos de estos parámetros se puede ajustar la propia nanoestructura a las necesidades del método. Por otro lado, también se pueden encontrar los quantum-dots y nanoclusters cuyas propiedades ópticas están relacionadas con la fluorescencia de los mismos.

La utilización de este tipo de nanoestructuras con propiedades ópticas, en combinación con biomoléculas como enzimas, ADN o anticuerpos, ha permitido mejorar exponencialmente el desarrollo de los biosensores.^{7,8}

1.2.1 Nanopartículas de oro en biosensores

Las nanopartículas de oro son preparadas fácilmente y han sido utilizadas durante años debido a su color intenso que varía dependiendo del tamaño de la partícula. Mientras que las nanopartículas de oro comparten las mismas cualidades para la aplicación biológica que el resto de las nanopartículas, estas tienen características que les dan ventaja, sus propiedades ópticas, su biocompatibilidad y la facilidad con la que es posible la modificación de su superficie con moléculas tioladas. Las nanopartículas de oro pequeñas (10-50nm de diámetro) en disolución aparecen con un color rojo oscuro. El origen físico de este fenómeno está

asociado con la oscilación colectiva de electrones de la superficie de las nanopartículas de oro inducidas por el campo electromagnético incidente. La posición dentro del espectro de la banda del plasmón de superficie está determinada por una combinación de características de la nanopartícula, como la composición, el tamaño y la forma. También depende de la agregación de las nanopartículas, cuando las nanopartículas se encuentran en un estado agregado, absorben como una única nanopartícula grande.⁷

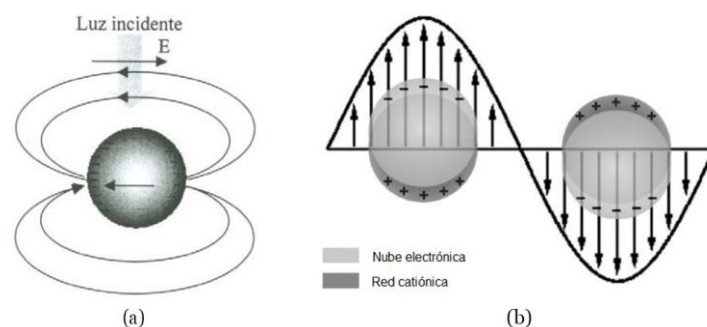


Figura 2. Representación esquemática del plasmón de nanopartículas. (a) considerando el campo eléctrico despolarizante en el interior de la nanopartícula. (b) descripción esquemática de desplazamientos de la nube electrónica en una nanopartícula bajo el efecto de una onda electromagnética.⁹

Cuando la luz visible incide en las AuNPs, la luz de una longitud de onda resonante es absorbida por las AuNPs e induce la oscilación colectiva de electrones de superficie llamada plasmón de superficie. AuNPs pequeñas, como por ejemplo de 13 nm de diámetro, absorben la luz verde, que corresponde a un ancho de banda de absorción (banda de plasmón de superficie) de aproximadamente 520 nm en el espectro de luz visible; por lo tanto las soluciones de AuNPs aparecen de color rojo.

Como se ha mencionado con anterioridad los biosensores de nanopartículas de oro están basados en las propiedades ópticas de estas, por lo que cualquier cambio en las nanopartículas, como la modificación de la superficie, agregación, el índice de refracción del medio, entre otras, causa el cambio colorimétrico. En el caso de la agregación, las nanopartículas absorben a longitudes de onda mayores, lo mismo ocurre con nanopartículas de oro de mayor tamaño.

Las nanopartículas de oro, así como otras nanopartículas metálicas, tienen diversas aplicaciones. Las nanopartículas de oro se aplican en métodos analíticos y en biosensorado de una amplia variedad de analitos, incluyendo ácidos nucleicos, proteínas, sacáridos, moléculas pequeñas, iones metálicos y células enteras.⁷

En cuanto a los métodos de síntesis destacan en 1951, Turkevich y sus colaboradores sintetizaron una estable dispersión roja profunda de nanopartículas de oro uniformes de 20 nm utilizando el citrato de sodio como reductor y estabilizador. Normalmente, las moléculas que contienen fosfatos y tioles se utilizan como estabilizadores mediante enlaces Au-P y Au-S. Aunque se ha observado que los fosfatos disueltos en agua estabilizan las AuNP de un tamaño pequeño, mientras que las cadenas tioladas se han establecido como estabilizadores predominantes de cualquier tamaño y forma de AuNP. En 1994, se descubrió otro tipo de

síntesis denominada Brust-Schiffrin, este método ha tenido un enorme impacto porque permite la fácil síntesis de las AuNP. Este método está basado en una única fase en la que la estabilización de las AuNP puede aplicarse a una variedad de cadenas tioladas.¹⁰

Debido a la necesidad de disponer de métodos rápidos y sencillos para la determinación de las aminas biógenas (ABs), y la aprovechando las propiedades espectroscópicas de las AuNPs (Plasmón 540nm), se busca desarrollar un método analítico en el que la formación de AuNPs esté relacionada con la concentración de analito involucrado en la reacción enzimática. Cuyo objetivo será la determinación de tiramina y cadaverina mediante la síntesis de nanoparticulas de oro a partir de Au(III) como consecuencia de las reacciones enzimáticas que tienen lugar (Figura 3). La idea se basa en que el Au(III) puede reemplazar el oxígeno, de forma que se lleva a cabo la regeneración de la enzima (TAOox/DAOox) gracias a que el Au(III) se reduce a AuNPs, cuya señal de absorción será proporcional a la concentración de AB. Se puede apreciar la presencia de dichas nanoparticulas mediante la absorción de banda plasmónica que aparece a 540nm, o mediante técnicas ópticas, este será el grueso del objetivo del trabajo, ya que ofrece la ventaja de ser un método rápido y de bajo coste y sin la necesidad de ningún instrumento analítico, la simple posesión de un smartphone.

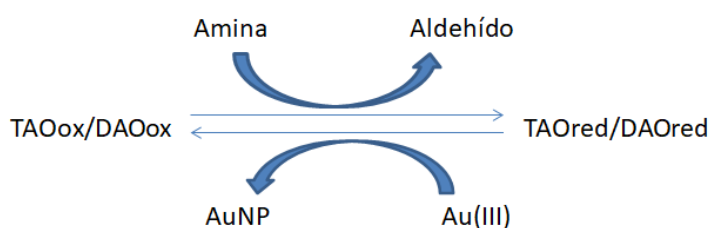


Figura3. Oxidación enzimática de la tiramina catalizada por la tiramina oxidasa (los subíndices "ox" y "red" se refieren a las formas oxidadas y reducidas de TAO, respectivamente)¹⁵

Gracias a la buena selectividad que existe entre TAO y tiramina y DAO y cadaverina podremos obtener resultados minimizando las interferencias.¹¹

1.3 Determinación aminas biógenas

Las aminas biógenas (AB) son una amplia familia de biomoléculas de bajo peso molecular que poseen en su estructura al menos un grupo amino. Entre sus funciones en el organismo se encuentran la intervención en procesos de transición sináptica, el control de la presión arterial, pero es debido a su gran papel como neurotransmisoras por lo que el organismo dispone de rutas para su síntesis a partir de aminoácidos precursores.¹¹

Pueden clasificarse en función de su estructura química en: aminas alifáticas, como la putrescina, cadaverina, espermina o espermidina; aminas aromáticas, como la feniletilamina y tiramina; y aminas heterocíclicas, como son la histamina y la triptamina. (Figura 4).

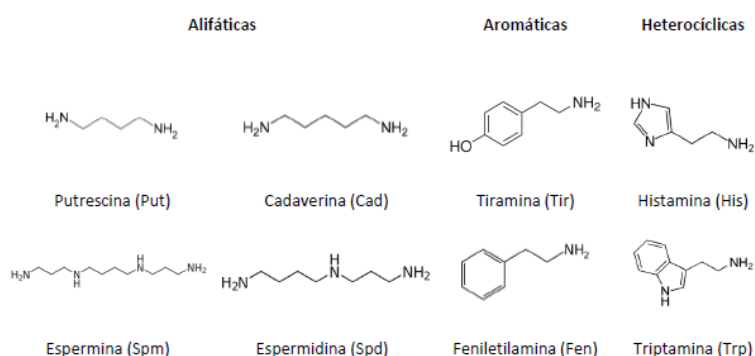


Figura 4. Estructura química de las aminas biógenas

La aminas biógenas se encuentran presentes en alimentos, la concentración de estas es dependiente de las condiciones de conservación (pH, temperatura...). La gran importancia del estudio de la concentración de las AB en alimentos se basa en su toxicología. De las mencionadas con anterioridad las que presentan mayor toxicidad son la tiramina y la histamina. Además, algunas de ellas como la cadaverina y la putrescina pueden reaccionar con nitritos dando lugar a nitrosaminas que son compuestos cancerígenos.¹²

Existen diferentes procedimientos analíticos para la determinación y cuantificación de aminas biógenas en alimentos. Estas técnicas pueden clasificarse en métodos ópticos y cromatográficos. Las técnicas cromatográficas permiten el análisis simultáneo de varias aminas, presentan mayor precisión, exactitud y especificidad comparado con el resto de metodologías. Dentro de las técnicas cromatográficas, se encuentran la cromatografía en capa fina, cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Entre estos métodos analíticos destaca el empleo de HPLC. La determinación de aminas biógenas por HPLC se basa en métodos de detección UV y/o de fluorescencia, sin embargo requiere de largos periodos de tiempo además de una derivatización con el cloruro de dansilo o el ortoftaldehído^{13,15}. Frente a ellas se encuentran los métodos ópticos entre los que cabe destacar su simplicidad, y su bajo coste, estas propiedades les permiten el uso como métodos de screening. El problema que encontramos en este método es el requerimiento de eliminación de interferencias y la detección de una única AB.¹⁴

El desarrollo de biosensores, entendidos como dispositivos que pueden medir selectivamente un parámetro en una muestra, ha sido posible gracias a la disponibilidad comercial de enzimas como la diamina oxidasa (DAO) o la tiramina oxidasa (TAO) y ha permitido satisfacer las necesidades más actuales de la industria alimentaria, que debido a su creciente interés en ofrecer alimentos de calidad, requería de métodos de análisis más rápidos y económicos que los utilizados hasta el momento.

Los sensores ópticos son usados como alternativa de los electroquímicos, presentando estos límites de detección semejantes a los amperométricos, existe una competencia entre los sensores eléctricos y ópticos debida a la capacidad de análisis remoto para la detección colorimétrica visual de estos último. El fundamento de los métodos ópticos clásicos para la

determinación de aminas biógenas, se basa en reacciones enzimáticas selectivas donde se detecta la presencia de H_2O_2 mediante la intervención de la enzima HRP (Peroxidasa de rábano picante) y un cromóforo o fluróforo, obteniendo así una respuesta colorimétrica. (Figura 5)

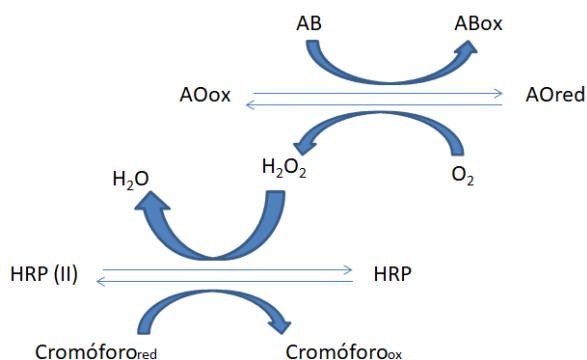


Figura 5. Esquema de las reacciones en que se basan los biosensores para la determinación de ABs.¹⁵

Existen distintas enzimas oxidasas en función del tipo de amina que oxidan. Algunas de ellas oxidan a un analito determinado como es el caso de la TAO con la tiramina y la DAO a la cadaverina y putrescina.¹⁵

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es desarrollar un método óptico enzimático que permita la determinación de tiramina y cadaverina de forma rápida. Para ello, se hará uso de las enzimas Tiramina Oxidasa (TAO) y Diamina Oxidasa (DAO) respectivamente (Figura 6), así como Au(III) para poder realizar la detección.

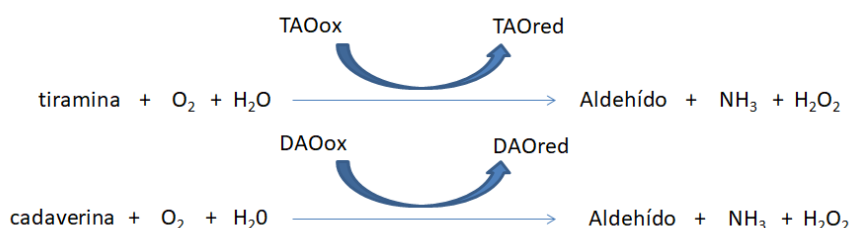


Figura6. Esquema de las reacciones llevadas a cabo en el estudio.

Los analitos que se quieren determinar, tiramina y cadaverina, son sustrato de las enzimas tiramina oxidasa (TAO) o diamina oxidasa (DAO) respectivamente, que oxidan su grupo amino a un aldehído en presencia de oxígeno. Esta reacción genera peróxido de hidrógeno y amoníaco. Las nanopartículas se formarán a partir de la enzima reducida, estas AuNPs son las responsables de la regeneración de la enzima en su forma oxidada. Gracias a la formación de

las AuNPs se puede determinar la presencia de los analitos correspondientes mediante análisis óptico.

El trabajo se estructurara de la siguiente forma:

1. Consulta de material bibliográfico y artículos sobre la temática estudiada
2. Estudio de las reacciones en disolución de la tiramina, cadaverina y putrescina con las correspondientes enzimas (TAO/DAO) y Au(III), observando la formación de nanopartículas.
3. Realizar un estudio de la repetitividad de la formación de nanopartículas en disolución.
4. Estudio de la inmovilización del Au(III).
5. Comparación cinética de diferentes enzimas, tiramina, cadaverina y putrescina.
6. Estudiar y optimizar los parámetros físicos y químicos de la reacción en celulosa.
7. Obtención de parámetros analíticos para diferentes concentraciones de amina.
8. Estudio de posibilidades de mejora de la inmovilización de reactivos en la celulosa.

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1. Estudio en disolución

Estudio de la reacción de formación de NPs en disolución mediante la reacción de oxidación de la enzima, que previamente ha sido reducida mediante la amina correspondiente. Los parámetros a estudiar serán la cinética de la reacción de tiramina junto con la repetitividad de este método, además de las características analíticas para la determinación de cadaverina y putrescina.

3.1.1. Estudio cinético de la reacción a diferentes concentraciones de tiramina

Se realizará la medida de absorbancia para diferentes concentraciones de tiramina, entre 72 μ M-290 μ M, además de 20 μ L de TAO de 50U/mL, 40 μ L de Au(III) de concentración 50mM y la cantidad restante hasta llegar a los 2mL de tampón fosfatos pH=7, la adicción de Au(III) se ejecutará a los 2 minutos del trascurso de la reacción. La disolución estará sometida a agitación y se realizará a una temperatura de 40°C. Se registra la variación de absorbancia con el tiempo a 540nm.

Se realiza el tratamiento de datos obtenidos para cada concentración de amina, de tal forma que se obtienen la siguiente gráfica en relación a la absorbancia frente al tiempo.

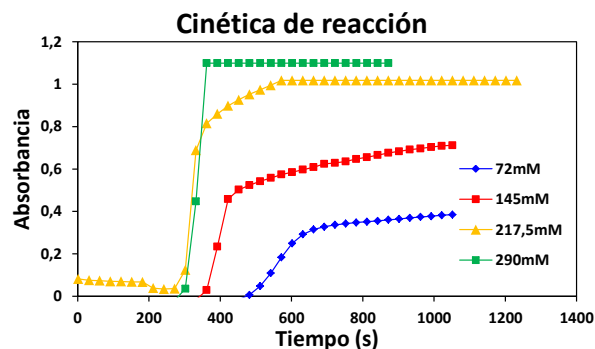


Figura 7. Señales de absorbancia para las diferentes concentraciones de tiramina

Como se puede comprobar la cinética de la reacción aumenta con la concentración de tiramina.

Se representa una recta de calibrado para obtener los parámetros analíticos: rango lineal, límite de detección y cuantificación.

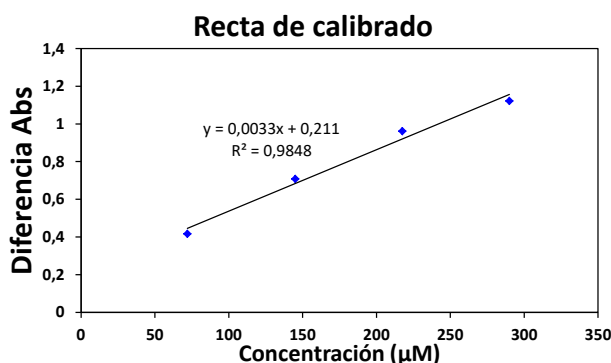


Figura 8. Señales de las diferencias de absorbancia frente a concentración

Al realizar la regresión lineal podemos concluir que todo el rango es lineal, en cuanto al límite de detección al no tener valores de medidas del blanco, se realiza el cálculo mediante el valor de la $S_{y/x}$ obtenida mediante el análisis de regresión, de tal forma que se obtiene un valor de $42,36\mu\text{M}$, hay que destacar que este valor será mayor que el obtenido con la desviación estándar del blanco.

3.1.2. Estudio de la repetitividad

Se realiza un estudio de la repetitividad en el rango inferior y el superior de concentraciones de tiramina, $5\mu\text{L}$ y $20\mu\text{L}$ para de esta forma optimizar el volumen de adicción en la cubeta. Se llevará a cabo por quintuplicado el experimento explicado en el apartado disoluciones de tiramina, obteniendo 5 espectros diferentes para cada volumen. Representando la gráfica absorbancia frente a tiempo, se obtiene el valor mínimo de absorbancia, momento en el que se empiezan a producir las nanoparticulas, y el valor máximo de absorbancia, momento en el

que las AuNP se estabilizan, con esta diferencia de absorbancias podremos calcular el valor de la desviación típica relativa.

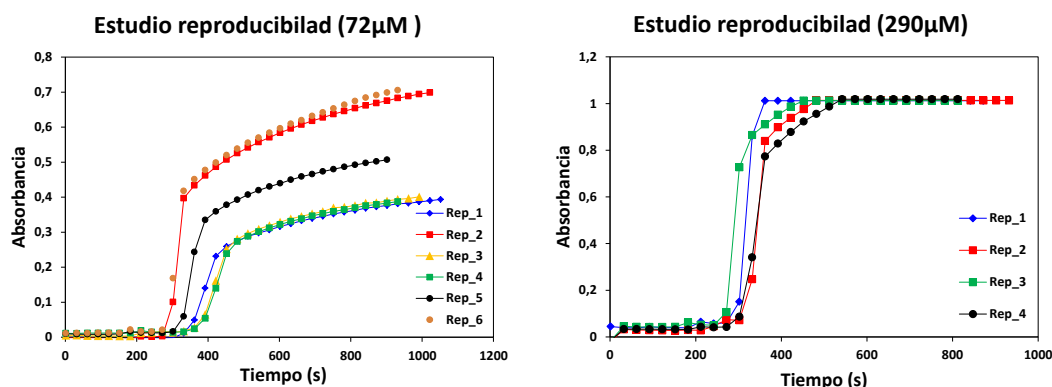


Figura 8. Señales de absorbancia para las diferentes medidas de repetitividad

El valor obtenido de DSR para 20 microlitros es de 1,06%, una repetición ha sido eliminada mediante el test de Q de Dixon. En cambio para 5 microlitros el valor obtenido es de 29,88%, este valor es más alto debido a que al coger un volumen tan pequeño con la micropipeta una pequeña fluctuación en dicho volumen cambia mucho la concentración que tenemos de tiramina en la cubeta, por lo que el valor de absorbancia no será tan reproducible. Debido a esto trabajaremos de aquí en adelante en el rango superior de concentraciones de enzima para obtener mejores valores de desviación.

3.1.3. Características analíticas del método en disolución para la determinación de cadaverina y putrescina

Se realiza un estudio comparativo de las características analíticas obtenidas para las enzimas cadaverina y putrescina, para ello se representan a continuación las gráficas obtenidas para las respectivas concentraciones de cada amina biógena:

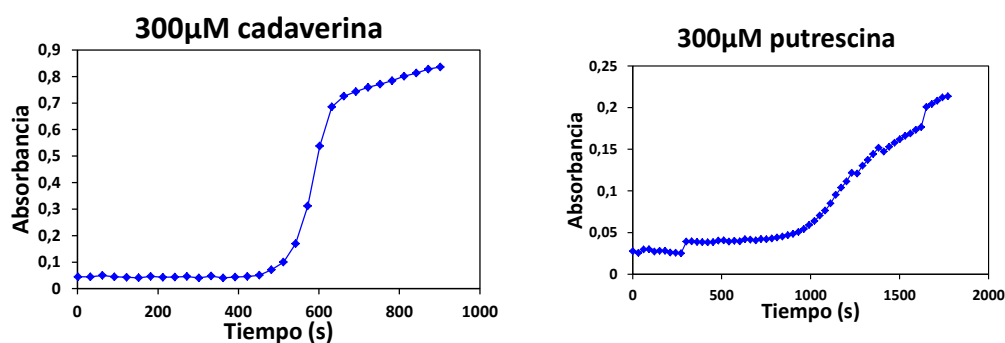


Figura 9. Señales de absorbancia para dos aminas biógenas, estudio comparativo

En estudios previos del laboratorio se ha comprobado que las cinéticas de las reacciones DAO/putrescina y DAO/cadaverina con colorante (ABTS) y siguiendo la reacción a través de las longitudes de onda de máxima absorbancia del colorante son iguales, de tal forma que no podemos diferenciar entre las dos ABs.¹⁶ En cambio si la reacción es realizada con nanopartículas de oro, midiendo la absorbancia a 540nm, con una temperatura de reacción de 45°C podemos diferenciarlas muy bien como se observa en las gráficas, ya que la cadaverina reacciona mucho antes que la putrescina, esto se debe a la cinética de la reacción, ya que la cadaverina forma un ciclo de 5 carbonos y la putrescina forma un ciclo de 4 carbonos.

3.2 Estudio en celulosa

Una vez comprobada la viabilidad de la metodología propuesta en disolución, el siguiente paso es el desarrollo de un biosensor enzimático, para el cual se elige la celulosa como soporte de inmovilización de los reactivos, tomando como referencia trabajos previos realizados por el grupo de investigación.¹⁷ El procedimiento de medida se llevará a cabo mediante la toma de fotos con un Smartphone y el uso de la aplicación Color Grab, mediante la cual se toman las medidas de las coordenadas RGB. Se realizará una representación de las variaciones sufridas por la coordenada G, ya que gracias a los estudios previos realizados por el laboratorio se sabe que esta coordenada provee una mayor sensibilidad y respuesta lineal.¹⁶

Se realiza un estudio de optimización de diferentes parámetros como paso previo a la obtención de la recta de calibrado.

3.2.1. Optimización porcentaje celulosa

Se realiza una optimización con disoluciones al 2%, 3% y 5% de celulosa, para ello se disolverá la cantidad necesaria de celulosa, para cada porcentaje (40mg, 60mg y 100mg), en 1960µL de tampón fosfatos y 40 de Au(III). Los estudios han sido realizados con las reacciones TAO/tiramina y DAO/cadaverina, esta última como modelo de reacción de la DAO. Los valores expresados a continuación son réplicas de las medidas obtenidas de la coordenada G.

PLACA 1					
2%		3%		5%	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
165	159	175	175	185	184
170	198	175	190	190	198

PLACA 2					
2%		3%		5%	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
198	206	183	191	194	185
200	207	195	192	187	187

PLACA 3					
2%		3%		5%	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
185	193	185	191	192	191
179	193	186	191	188	192

Figura 10. Datos obtenidos de la coordenada G en las placas de pocillos

Los datos resaltados en naranja son eliminados aplicando el test Q de Dixon.

Se obtienen las siguientes distribuciones al representar los valores de la coordenada G para las diferentes concentraciones de celulosa.

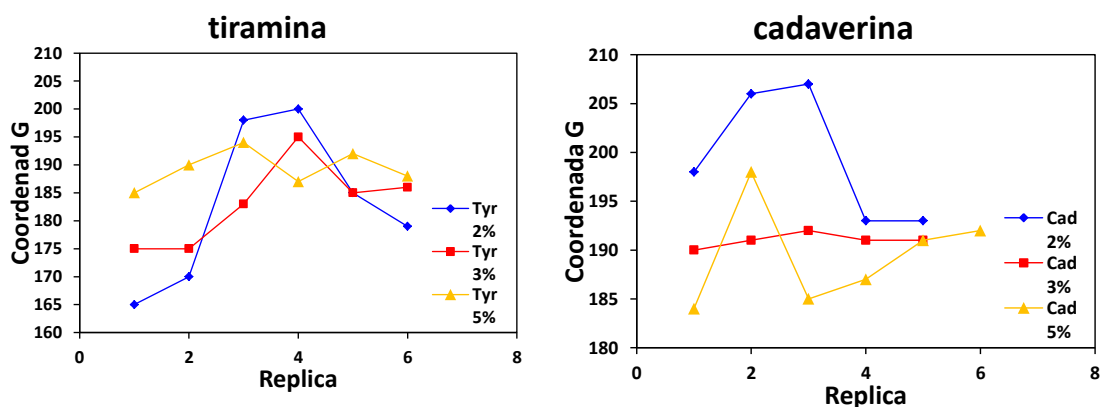


Figura 11. Representación de la distribución de los datos obtenidos

Con los cálculos pertinentes se obtienen los siguientes valores de DSR, correspondientes a los valores expresados en la figura 10.

2%		3%		5%	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
7,838%	3,412%	3,872%	3,485%	1,757%	2,767%

Figura 12. Valores obtenidos de DSR

A la vista de los datos de DSR y dado que los valores de señal no son muy diferentes entre ellos, se estableció que los mejores soportes para llevar a cabo las medidas eran aquellos compuestos al 5% de celulosa.

3.2.2. Optimización de la concentración de Au(III)

Se proseguirá realizando un estudio con el que concluir como y cuando adicionar el Au(III), para ello se realizará la adicción del Au(III) de dos formas distintas. (1) Adicción de diferentes concentraciones de Au(III) tras tener secas las celulosas, 5mM, 10mM y 20mM, una vez seco el oro se añadirá las disoluciones con las enzimas. (2) Adicción del Au(III) a la propia disolución de celulosas, se preparan disoluciones por triplicado de concentraciones 0,5mM, 1mM y 2mM, estas serán inmovilizadas en tres placas y se nombraran de la siguiente forma:

- D.1.0 , D.1.1 y D.1.2 para las disoluciones de concentración 0,5mM en Au(III).
- D.2.0 , D.2.1 y D.2.2 para las disoluciones de concentración 1mM en Au(III).
- D.3.0 , D.3.1 y D.3.2 para las disoluciones de concentración 2mM en Au(III).

Estas disoluciones se distribuirán en 3 placas de tal forma que una sólo haya disoluciones de D.1.0, D.2.0, D.3.0 mientras que en las otras dos placas pondremos todas las disoluciones explicadas anteriormente.

El método de adicción de Au(III) una vez que se hayan secado las celulosas queda desechado ya que no se forman nanoparticulas, o el color amarillo característico del Au(III) impide ver la formación de estas. Por lo que el procedimiento a seguir será la disolución del Au(III) con propia disolución de celulosas, lo que implica la inmovilización del Au(III) a la vez que se secan las celulosas, para este método se obtienen los siguientes valores de la coordenada G.

0,5mM			1mM			2mM		
	Tyr	Cad		Tyr	Cad		Tyr	Cad
D.1.0	188	192	D.2.0	174	175	D3.0	173	153
	188	197		179	174		173	164
	191	196		186	181		183	164
	195	192		188	185		196	162
	178	173		187	182		185	162
	170	148		184	183		201	166
	192	199	D.2.1	189	188	D.3.1	192	189
D.1.1	197	196		189	187		199	182
	181	195		197	189		192	164
	189	189		193	213		199	172
D.1.2	195	195	D.2.2	193	213	D.3.2	211	206
	197	199		187	216		208	201
	194	193		164	212		211	181
	197	198					211	178

Figura 13. Datos obtenidos de la coordenada G para las diferentes disoluciones

Cabe destacar que en la tabla de 1mM se ha eliminado el dato resaltado en rojo aplicando Q de Dixon, se han calculado los valores de DSR de tal forma que se obtiene.

0,5mM		1mM		1mM	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
4,262%	7,246%	3,316%	8,051%	6,714%	8,987%

Figura 14. Valores obtenidos de DSR

Observando los datos obtenidos de DSR, se concluye que para las concentraciones 0,5mM y 1mM son más bajas y no hay gran diferencia entre ellas pero al fijarnos en los datos vemos una distribución más homogénea en la de 1mM, por ello nos quedaremos con dicha concentración en lo que respecta de trabajo, de tal forma que las disoluciones serán preparadas con celulosa al 5% en 1960μL de tampón fosfatos con 40μL de Au(III) 50mM, de esta disolución se adicionan 75μL por pocillo.

3.2.3. Optimización concentración de fosfatos

Se comienza el estudio preparando disoluciones de Au(III) en ausencia y en presencia de fosfatos (tampón fosfatos pH=7), tras varios días de investigación, se concluye que con agua no se forman las nanoparticulas, esto puede ser debido a que las nanoparticulas se forman alrededor de la esfera de los fosfatos, de tal forma que se forman unas estructuras que actúan como un agentes protectores de las nanoparticulas^{18,19}, cosa que no ocurre con el agua. Este hecho se ha observado también estudios previos realizados en el laboratorio, donde se ha comprobado que los fosfatos intervienen en la formación de las nanopartículas, por lo que es necesario estudiar la concentración de fosfatos que resulta más adecuada para la formación de los NPs sobre soportes de celulosa.¹¹

Se procede a estudiar la concentración óptima de fosfatos, para lo que se preparan disoluciones 0,05M, 0,1M y 0,2M de tampón fosfatos, y además se vuelve a estudiar qué ocurre si disolvemos el Au(III) en agua. A continuación se detallan los valores de la coordenada G obtenidos para las disoluciones mencionadas.

Placa 1							
0,05M		0,1M		0,2M		Agua	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
174	165	177	156	173	161	212	214
176	164	167	157	171	132	208	211
175	167	160	163	155	135	no hay color, estan blancas	
162	166	165	154	-	-		

Placa 2							
0,05M		0,1M		0,2M		Agua	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
181	173	183	160	184	171	206	211
181	170	170	155	174	140	204	217
187	167	160	165	161	139	no hay color, estan blancas	
178	159	167	167				

Placa 3							
0,05M		0,1M		0,2M		Agua	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
179	167	168	157	182	133	205	216
176	164	162	159	194	133	209	197
183	160	150	157	192	135	no hay color, estan blancas	
162	162	157	160				

Figura 15. Datos obtenidos de la coordenada G para las distintas concentraciones y agua

Los valores de DSR obtenidos son los siguientes

0,05M		0,1M		0,2M		Agua	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
4,295%	2,396%	5,327%	2,539%	7,463%	9,873%	1,420%	3,457%

Figura 16. Valores obtenidos de DSR

Como se ha mencionado con anterioridad en el caso del agua no se producen nanoparticulas y en cuanto a las concentraciones de fosfatos observamos que los valores de DSR de 0,05M son ligeramente menores a los de 0,1M, es por esto que se hará uso de una concentración de tampón de 0,05M.

3.2.4. Optimización del pH

Una vez conocida la concentración óptima de fosfatos se investigará el pH adecuado para la disolución amortiguadora, para ello se preparan disoluciones a pH 6, 7 y 8. Para ello se realizaran 3 disoluciones de cada pH, obteniendo de esta forma 9 réplicas para cada pH, de tal forma que se obtuvieron los siguientes valores de la coordenada G.

Placa 1					
pH 6		pH 7		pH 8	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
230	216	198	182	207	196
227	223	197	188	207	199
223	220	199	188	210	199

Placa 2					
pH 6		pH 7		pH 8	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
224	220	202	183	210	197
226	225	201	186	212	200
224	221	202	192	217	201

Placa 3					
pH 6		pH 7		pH 8	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
221	215	193	186	198	193
225	220	194	185	206	193
213	216	197	189	210	192

Figura 17. Datos obtenidos de la coordenada G para los diferentes valores de pH

Representando los valores obtenidos se obtiene las siguientes gráficas para cada enzima.

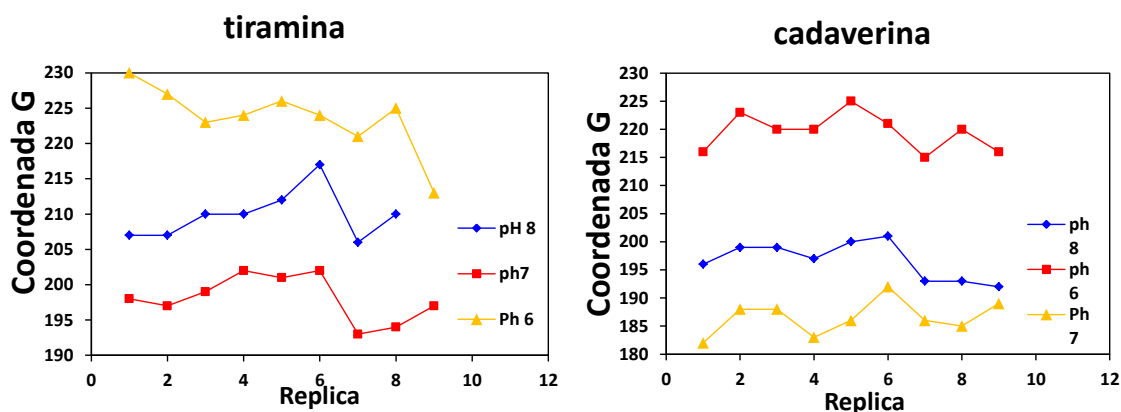


Figura 18. Representación de los datos obtenidos para los distintos pH

Los valores de DSR obtenidos son los expresados a continuación

pH 6		pH 7		pH 8	
Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
2,121%	1,530%	1,644%	1,655%	2,470%	1,705%

Figura 19. Valores obtenidos de DSR

Como podemos observar los menores valores de DSR se obtienen a pH 7 por lo que se realizaran las siguientes operaciones con un tampón de fosfatos 0,05M a pH 7.

3.2.5. Optimización tiempo de adicción

Se realiza un estudio del tiempo de adicción de la disolución compuesta por el analito, la enzima correspondiente y el tampón fosfatos, debido a que la formación de las NPs tiene lugar cuando el Au(III) oxida a la enzima en su forma reducida, pero en competencia con el oxígeno, es por esto que se debe esperar a que transcurra la reacción enzimática para que se consuma el oxígeno. Para la optimización del tiempo de adicción se realiza un estudio del tiempo de acción de las enzimas a las celulosas, para ello se estudiara la adicción desde el minuto 0 de la reacción entre las enzimas hasta el minuto 10, llevando a cabo adicciones cada dos minutos. Se obtienen los siguientes datos de la coordenada en cada placa.

PLACA 1						
	Tyr 1	Tyr 2	Tyr 3	Cad 1	Cad 2	Cad 3
t=0	163	179	197	170	164	165
t=2	180	185	197	190	183	174
t=4	167	183	197	186	175	168
t=6	176	182	187	173	172	163
t=8	181	176	190	176	175	163
t=10	184	179	194	180	184	161

PLACA 2						
	Tyr 1	Tyr 2	Tyr 3	Cad 1	Cad 2	Cad 3
t=0	179	189	197	186	164	167
t=2	188	185	197	184	176	182
t=4	177	191	197	183	172	168
t=6	184	188	188	177	172	167
t=8	187	177	179	172	174	167
t=10	180	179	188	186	179	164

PLACA 3						
	Tyr 1	Tyr 2	Tyr 3	Cad 1	Cad 2	Cad 3
t=0	182	176	199	189	173	171
t=2	187	183	193	180	167	153
t=4	169	191	196	187	169	163
t=6	187	187	188	178	173	163
t=8	192	177	183	176	170	165
t=10	182	179	188		177	165

Figura 20. Datos obtenidos de la coordenada G para los diferentes tiempos de adicción

Se refleja a continuación los valores de DSR y los promedios obtenidos de todos los valores expresados en las tres placas.

	tiramina		cadaverina	
	PROMDEUDIO	DSR	PROMDEUDIO	DSR
t=0	184,556	6,480%	172,111	5,407%
t=2	188,333	3,219%	176,556	6,244%
t=4	185,333	6,407%	174,556	5,020%
t=6	185,222	2,173%	170,889	3,198%
t=8	182,444	3,267%	170,889	2,873%
t=10	183,667	2,894%	174,500	5,573%

Figura 21. Valores obtenidos promedio y DSR

A continuación se representan gráficas para cada enzima de los valores promedio de la coordenada obtenidos a los diferentes tiempos de adicción.

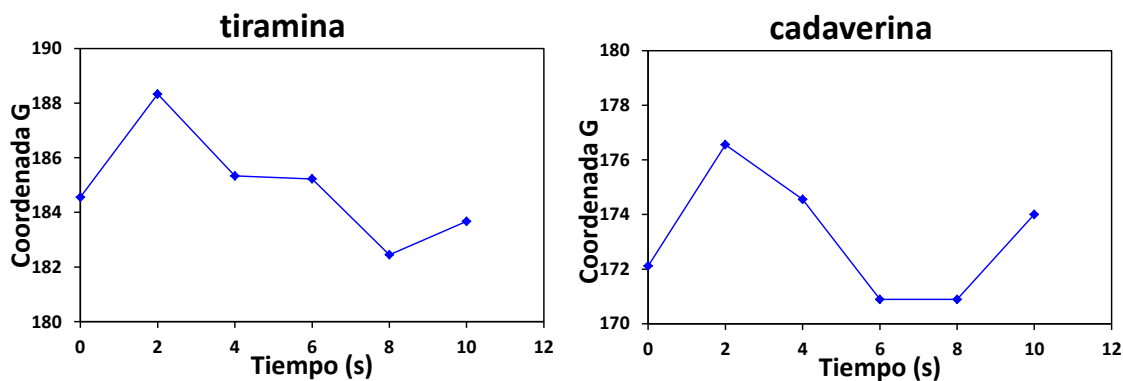


Figura 22. Representación del promedio los datos obtenidos para los distintos tiempos de adición

Se realizara la adición a los 2 minutos del transcurso de la reacción en cubeta ya que para todos los tiempos obtenemos valores de DSR bajos, pero justamente a los 2 minutos podemos observar que se obtiene el valor máximo del promedio de la coordenada como se puede observar en la gráfica anterior.

3.2.6. Optimización tiempo de medida y temperatura del transcurso de la reacción

Para finalizar el proceso de optimización se procede a estudiar el tiempo de medición de las nanopartículas, para ello se toman medidas a los 15, 30, 60 minutos, continuando cada hora hasta llegar a las 7 horas, se realizará también una medida al día siguiente. Durante este estudio se tomaran medidas de dos placas distintas, una que permanecerá en la incubadora a 40°C, y otra que permanecerá a temperatura ambiente tapada con una caja para que las nanopartículas no se vean dañadas por la luz. Los datos obtenidos para la coordenada G se reflejan a continuación.

	t=15min		t=30min		t=60min		t=2h		t=3h		t=4h		t=5h		t=6h		t=7h	
	Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad	Tyr	Cad
T=40°C	192	194	189	195	187	195	192	201	186	192	189	197	190	200	199	212	197	205
	183	203	177	203	180	197	185	204	180	202	186	202	187	201	198	212	193	207
	186	209	186	209	181	213	190	213	187	211	190	209	176	203	194	213	188	207
	208	208	206	209	208	210	216	216	210	208	211	210	200	200	212	212	203	205
	203	203	209	216	206	215	210	218	208	214	208	215	192	205	205	218	198	209
		217		219		218		226		217		219		206		216		209
T ambiente	200	187	179	170	191	171	181	162	188	162	185	161	196	179	182	161	194	164
	184	183	168	168	167	168	159	164	165	164	164	164	182	178	166	158	175	165
	187	185	169	178	172	172	169	168	173	172	174	172	178	173	164	155	172	162
	197	197	187	182	182	179	184	176	185	179	183	175	186	176	169	160	176	165
	204	200	188	179	184	181	185	173	188	173	186	173	184	173	168	155	177	164
	195	194	182	173	172	168	167	166	170	166	171	166	164	165	150	148	160	155

Figura 23. Datos obtenidos de la coordenada G para los diferentes tiempos de medida y temperatura

Se realizan los cálculos oportunos, obteniendo los valores de la desviación estándar relativa para los valores de la coordenada G tomados a diferentes tiempos, y mediante los dos métodos aplicados 40°C y temperatura ambiente.

	t=15min		t=30min		t=60min		t=2h		t=3h		t=4h		t=5h		t=6h		t=7h	
	tyr	cad	tyr	cad	tyr	cad	tyr	cad	tyr	cad	tyr	cad	tyr	cad	tyr	cad	tyr	cad
T=40°C	5,547%	3,737%	7,057%	4,178%	7,075%	4,651%	6,826%	4,344%	7,102%	4,396%	5,963%	3,889%	4,613%	1,278%	3,483%	1,198%	2,876%	0,864%
T ambiente	3,939%	3,642%	4,842%	3,151%	5,112%	3,214%	6,124%	3,200%	5,651%	3,803%	5,016%	3,331%	5,801%	2,908%	6,169%	3,015%	6,222%	2,359%

Figura 24. Valores obtenidos de DSR

Se concluye que las medidas se tomaran a temperatura ambiente, ya que se producen antes las nanopartículas, y a los 30 min de adición ya que es entonces cuando se estabilizan los valores obtenidos en la coordenada G, cosa que nos interesa ya que el objetivo del trabajo es desarrollar un método rápido.

Una vez optimizado el procedimiento de medida y la preparación del soporte, el siguiente paso sería la obtención de las características analíticas del método mediante una recta de calibrado.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1. Reactivos y disoluciones

4.1.1. Reactivos generales

- Disoluciones amortiguadoras $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ de pH 6, 7 y 8 de concentración en torno a 0,05M, 0,1 M y 0,2M preparadas disolviendo la cantidad correspondiente de Na_2HPO_4 (Panreac 131679.1211) en un volumen también aproximado de 50 mL de agua miliQ y ajustando el pH con una disolución de HCl 1 M.
- Disolución de tetracloraurato (III) de sodio dihidratado, $\text{AuCl}_4\text{Na}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (99,8% Au), (Stream Chemicals 79-0500), se disuelve en agua hasta obtener una concentración 50mM.
- Disolución de celulosa + Au(III): disolución de celulosa microcristalina de 20 micras (Sigma-Aldrich 310697-50G) al 5% se prepara disoluciones de 2 mL, pesando aproximadamente 100mg de celulosa y disolviéndolo en 1960μL de tampón fosfato más 40μL de oro(III).
- Disolución de celulosa: disolución de celulosa microcristalina de 20 micras (Sigma-Aldrich 310697-50G) al 5% se prepara disoluciones de 2 mL, pesando aproximadamente 100mg de celulosa y disolviéndolo en 1960μL de tampón fosfato.

4.1.2. Disoluciones de enzimas

- Enzima tiramina Oxidasa (TAO) (Asahi kasei pharma T-25) 4,600 U/mg. Se prepara una disolución disolviendo aproximadamente 5,45mg de TAO en 0,5 mL de agua miliQ, obteniendo así una concentración aproximada de 50U/mL.

- Disolución de diamina oxidasa (DAO) de 150 U/mL: Molirom en tampón fosfatos 0,1M pH=6.

4.1.3. Aminas

- tiramina (Tiramyne hydrochloride)(TYR) (Sigma-Aldrich 53300) 98 % pureza, se preparan disoluciones de 5mg/mL.
- cadaverina (cadaverine dihydrochloride)(CAD) (Sigma-Aldrich C8561) 98% pureza, se preparan disoluciones del orden de 5,50mg/mL.
- putrescina (Putrescine dihydrochloride) (PUT) (Sigma-Aldrich P7505) 98% pureza, se preparan disoluciones del orden de 4,80mg/mL.

4.2. Instrumentación y material

4.2.1 Instrumentos

- Espectrofotómetro de fotodiodos UV-Vis Agilent 8453A, que permite medir entre 190-1100nm y dispone de una rendija de 1nm. Posee adaptadores intercambiables que permiten medir en cubeta termostatzada con agitación.
- pH-metro CRISON, Basic 20.
- Balanza analítica modelo GR-202-EC de precisión $\pm 0,01$ mg.
- Móvil Samsung Galaxy S7 Edge con una cámara integrada de 12 Megapíxeles y sistema operativo Android 9.0 con aplicación Color Grab®, del equipo Loomatix, capaz de recoger, capturar y reconocer colores en código RGB.

4.2.2 Materiales

- Vasos de precipitados
- Micropipetas Socorex de volúmenes 5-50 μ L, 10-100 μ L y 100-1000 μ L.
- Material desechable: puntas de micropipetas, Eppendorf, pipetas Pasteur, tubos Falcon, cubetas.
- Agitador magnético A-01, SBS
- Tiras reactivas para la determinación semicuantitativa de peróxido de hidrógeno (Quantofix 913 19).
- Incubadora OVAN modelo OM10 E.
- Placas de pocillos nunc™.

4.3. Procedimiento operativo

4.3.1. Método en disolución

Se llevan a cabo las medidas de absorbancia en el espectrofotómetro de absorción molecular UV-Vis. Para ello se utilizarán cubetas de plástico de 1 cm de paso óptico con una capacidad de volumen total de 4mL.

Antes de comenzar a medir, cada día se deberá realizar un blanco de medida, que consiste en realizar una medida a una disolución de tampón fosfatos a un pH aproximado de 7.

Para realizar las medidas se utilizara el método “kinetics” del programa en el que se permite ver específicamente el registro cinético de absorbancia a 540nm en este caso (aunque el equipo está registrando el espectro completo), como “run time” pondremos 1800s para que dé tiempo a que haya transcurrido la reacción, en el apartado “cycle time” pondremos 30s para que se realicen medidas cada dicho intervalo de tiempo.

4.3.1.1 Disoluciones de tiramina

Se realizará la medida de absorbancia para diferentes concentraciones de tiramina, entre 72μM-290μM, para ello se añadirá en cada cubeta 5μL, 10μL, 15μL y 20μL de la disolución preparada de tiramina respectivamente, además de 20μL de TAO, 40μL de Au(III) de concentración 50mM y la cantidad restante hasta llegar a los 2mL de tampón fosfatos pH=7, la adicción de Au(III) se ejecutará a los 2 minutos del trascurso de la reacción, ya que es necesario que haya transcurrido totalmente la reacción enzimática y se haya producido el consumo de O₂ disuelto en la disolución, la disolución estará sometida a agitación y se realizará a una temperatura de 40°C. Se registra la variación de absorbancia con el tiempo a 540nm.

4.3.1.2 Disoluciones de cadaverina y putrescina

Se lleva a cabo un estudio similar al anterior, pero en este caso con dos aminas diferentes, cadaverina y putrescina, en esta ocasión la reacción transcurrirá a 45°C. Se añadirá a cada cubeta 20μL o 40μL de las disoluciones de dichas aminas, 10μL DAO de una concentración aproximada de 150U/mL, la cantidad correspondiente de tampón pH=7, y en este caso los 40μL de Au(III) se adicionarán los 5 minutos del transcurso de la reacción. Se registra la variación de absorbancia con el tiempo a 540nm.

4.3.2. Método en celulosa

El procedimiento general a seguir será la formación de unas celulosas en las que se adicionarán los reactivos tratados en el método en disolución. Para ello principalmente se formarán las celulosas mediante la disolución de estas junto con la disolución del Au(III) en ellas, el secado e inmovilización del Au(III) se realizará en incubadora a 40°C. Una vez estas estén secas, se preparan las disoluciones a añadir, estas serán preparadas en cubetas. Por un lado se realizara una disolución con 10 µL de DAO con una de concentración 150U/mL y 40 µL de Cad con concentración aproximada de 5,50mg/mL, de los cuales añadiremos 10µL a cada pocillo una vez hayan transcurrido 2 minutos de dicha reacción. Por otro lado se realizara la disolución de 20µL Tyr con una concentración de 5mg/mL y 20µL TAO con una concentración aproximada de 50U/mL, de la que se añadirán 10µL por pocillo una vez hayan pasado 2 minutos del transcurso de la reacción. Se deberá tomar nota del número de placa y de la posición en la que se ha depositado cada enzima para tenerlo en cuenta en el tratamiento de los datos.

5. CONCLUSIONES

Se ha estudiado un método analítico útil para la determinación de tiramina y cadaverina para el control de la calidad en alimentos. Debido a la suspensión de la actividad presencial por la pandemia del COVID-19 no se ha podido dar por concluido el trabajo, ya que solo dio tiempo de realizar la parte en disolución y de la parte en celulosa la optimización de dicho método.

Para finalizar el trabajo habría que obtener las características analíticas, tanto para la determinación de tiramina como de cadaverina y realizar una aplicación sobre muestras reales. Además en función de los resultados obtenidos y para dar un paso más en el desarrollo del biosensor, estaba previsto estudiar la posibilidad de inmovilizar la enzima correspondiente (TAO ó DAO) junto con el Au(III) en el soporte de celulosa.

Las conclusiones obtenidas son:

- Se ha comprobado la viabilidad del método en disolución para la determinación de ABs (tiramina y cadaverina) en base a la generación "in situ" de nanopartículas de oro durante la reacción enzimática correspondiente (Tiramina oxidasa, Diamino oxidasa).
- Se han dado los primeros pasos hacia el desarrollo de un biosensor enzimático para la determinación del ABs (tiramina y cadaverina) basado en la generación de nanopartículas de oro mediante la reacción enzimática correspondiente.
- Se ha comprobado que los mejores resultados se obtienen utilizando como soporte sólido de celulosa al 5%, se deben hacer en disolución de fosfatos 0.05M a pH 7
- Se han optimizado las condiciones para la inmovilización de Au(III) en el soporte de celulosa, para ello la disolución de celulosa será 1mM, por lo que la concentración de Au(III) por pocillo será de 0,075µM.

- Se ha probado que la mejor formación de nanopartículas se produce realizando la adición de las disoluciones de las enzimas preparadas en las cubetas a los 2 minutos del comienzo de esta.
- Se ha optimizado tiempo al que se realiza la medida de las nanopartículas debe ser a los 30 minutos y temperatura ambiente.

Estudios futuros:

- Obtener las características analíticas del método mediante la realización de una recta de calibrado.
- Estudiar la posibilidad de inmovilizar la enzima (TAO ó DAO) en las celulosas, de tal forma que una vez secas las celulosas únicamente se tuviera que añadir los analitos correspondientes (tiramina y cadaverina). Este experimento se iba a llevar a cabo para intentar acortar los tiempos del método óptico.

6.BIBLIOGRAFÍA

- (1) Calvo Pérez, A. Desarrollo y Aplicación de Sensores y Biosensores Electroquímicos Para La Determinación de Contaminantes Medioambientales y Agroalimentarios, Universidad de Burgos, 2014.
- (2) Lai, T.; Hou, Q.; Yang, H.; Luo, X.; Xi, M. Clinical Application of a Novel Silver Nanoparticles Biosensor Based on Localized Surface Plasmon Resonance for Detecting the Microalbuminuria. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **2010**, 42 (11), 787–792. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq085>.
- (3) Choi, M. M. F. Progress in Enzyme-Based Biosensors Using Optical Transducers. *Microchim. Acta* **2004**, 148 (3–4), 107–132. <https://doi.org/10.1007/s00604-004-0273-8>.
- (4) Torres Ramírez, E.; Méndez Albores, A. Biosensores Enzimáticos. *Rev. Digit. Univ.* **2014**, 15 (12), 1607–6079.
- (5) Casado-Terrones, S. Desarrollo de Sensores Ópticos y Métodos Separativos Como Herramientas Actuales En Química Analítica. Comparación Metodológica, Universidad de Granada, 2007.
- (6) Flores, C. Nanopartículas de Plata Con Potenciales Aplicaciones En Materiales Implantables: Síntesis, Caracterización Físicoquímica y Actividad Bactericida, Universidad nacional de la Plata, 2014. <https://doi.org/10.35537/10915/34946>.
- (7) Wajsblat, M.; Silberstein, C. *Campylobacter Fetus Fetus*, Universidad ORT Uruguay, 2016.
- (8) Vanesa, J. Tesis Doctoral Manipulación de Fluorescencia Molecular Mediante Nanopartículas Metálicas Autor : Jesica Vanesa Pellegrotti, “Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. <http://digital.bl.fcen.uba.ar/>,” 2015.
- (9) Br.Kelman Widman Marin Rengifo. Resonancia de Plasmones Localizados En Nanopartículas Metálicas, Universidad Nacional de Trujillo, 2013.
- (10) Pelaz, B.; del Pino, P. *Synthesis Applications of Gold Nanoparticles*, 1st ed.; Elsevier LTD.: Zaragoza, 2012; Vol. 4. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415769-9.00001-7>.

- (11) Navarro, J.; de Marcos, S.; Galbán, J. Colorimetric-Enzymatic Determination of Tyramine by Generation of Gold Nanoparticles. *Microchim. Acta* **2020**, *187* (3).
<https://doi.org/10.1007/s00604-020-4141-y>.
- (12) Gardini, F.; Özogul, Y.; Suzzi, G.; Tabanelli, G.; Özogul, F. Technological Factors Affecting Biogenic Amine Content in Foods: A Review. *Front. Microbiol.* **2016**, *7* (AUG), 1–18.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01218>.
- (13) Mehdi Triki. AMINAS BIÓGENAS EN PRODUCTOS CÁRNICOS MÁS SALUDABLES EN BASE A SU CONTENIDO LIPÍDICO, Universidad Complutense de Madrid, 2013.
- (14) Fuentes, A.; Fernández, I.; García, E. Determinación De Aminas Biógenas Mediante Cromatografía Líquida De Alta Resolución (Hplc), Universitat Politècnica de València, 2017.
- (15) Oliver L., S. Determinación Rápida y Específica de Tiramina. Desarrollo de Tiras Reactivas Para El Control de Calidad En Alimentación. Rapid, Universidad de Zaragoza, 2018.
- (16) Navarro, J.; Sanz-Vicente, I.; Lozano, R.; de Marcos, S.; Galbán, J. Analytical Possibilities of Putrescine and Cadaverine Enzymatic Colorimetric Determination in Tuna Based on Diamine Oxidase: A Critical Study of the Use of ABTS. *Talanta* **2020**, *208* (May 2019), 120392. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120392>.
- (17) Sanz-Vicente, I.; López-Molinero, Á.; de Marcos, S.; Navarro, J.; Cebrián, P.; Arruego, C.; Visiedo, V.; Galbán, J. Smartphone-Interrogated Test Supports for the Enzymatic Determination of Putrescine and Cadaverine in Food. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02677-7>.
- (18) Lucioni, A. C. SÍNTESIS DE NANOPARTÍCULAS DE ORO OBTENIDAS POR REDUCCIÓN DE H[AuCl₄]. *J. Clin. Rehabil. Tissue Eng. Res.* **2012**, *11* (40), 8196–8200.
- (19) Maya Toribio Olea. “ Síntesis y Caracterización de Nanopartículas de Fosfato de Calcio Para La Regeneración de Tejidos ,” Universitat Politècnica de Catalunya, 2014.